动 物 学 研 究 2004, Apr. 25 (2): 132 ~ 136 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

常氧下高原鼠兔 HIF-1α mRNA 的表达

赵同标[1,2]，赵新全[1,*]，常智杰[3]，孙 平[1,2]，
徐世晓[1,2]，赵 伟[1,2]

（1. 中国科学院西北高原生物研究所，青海 西宁 810001；2. 中国科学院研究生院，北京 100039；
3. 清华大学 生物科学与技术系基因组研究所，北京 100084）

摘要：低氧诱导因子 - 1（HIF-1）是一种由低氧诱导因子 - 1α（HIF-1α）和芳香烃核受体转录因子（ARNT）组成的二聚体转录因子，在生物体氧平衡调节中起关键作用。高原鼠兔（*Ochotona curzoniae*）是生活在青藏高原海拔 3 000 m 以上区域，有着极强的低氧、低温耐受能力的特有自然种群。它通过高的基础代谢率和高的氧利用率来适应高原低温、缺氧环境。将高原鼠兔带到北京，常氧室温条件下适应 7 d。RT-PCR 扩增高原鼠兔 HIF-1α cDNA 片断，^{32}P 标记作为特异性探针，Northern 杂交检测了常氧条件下高原鼠兔 HIF-1α 的组织特异性表达。结果显示，HIF-1α mRNA 在高原鼠兔多种组织中均有表达，并且表现出明显的组织差异性。其中脑的表达量最大，肾其次，心、脾和肝的表达相对较少。

关键词：高原鼠兔；低氧诱导因子-1α；RT-PCR；Northern 杂交；青藏高原
中图分类号：Q959.836 **文献标识码**：A **文章编号**：0254 - 5853(2004)02 - 0132 - 05

Tissue Specific Expression of Plateau Pikas (*Ochotona curzoniae*) HIF-1α mRNA Under Normal Oxygen

ZHAO Tong-biao[1,2], ZHAO Xin-quan[1,*], CHANG Zhi-jie[3], SUN Ping[1,2],
XU Shi-xiao[1,2], ZHAO Wei[1,2]

(1. *Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining* 810001, *China*;
2. *Graduated School of the Chinese Academy Sciences, Beijing* 100039, *China*; 3. *Tsinghua Institute of Genome Research, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing* 100084, *China*)

Abstract: Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), which is a transcription factor composed of HIF-1α and arylhydocarbon nuclear receptor translocator (ARNT), plays an important role in the signal transduction of cell response to hypoxia. Plateau pikas (*Ochotona curzoniae*), which are a kind of high anoxia-tolerance and cold adaptation species lived only above 3 000 m on Qinhai-Tibet Plateau, have unusual high RMR and NST, acting mainly via increasing NST to adapt to extreme cold of the Qinghai-Tibet Plateau; and high ratio of oxygen utilizing to cope with plateau hypoxia environment. In this study, the plateau pikas were taken to Beijing and adapted under normal oxygen and room temperature for 7 days. One fragment of the plateau pika HIF-1α cDNA was obtained by RT-PCR technique and labeled with ^{32}P as specific probe. Northern blot analysis showed that HIF-1α mRNA was expressed in many kinds of tissues and displayed a tissue specific expression: the highest in brain, next in kidney, and much less in heart, liver, and spleen.

Key words: Plateau pika; HIF-1α; RT-PCR; Northern blotting; Qinghai-Tibet Plateau

低氧诱导因子 - 1（hypoxia-induced factor-1，HIF-1）是 1992 年 Semanza 等在低氧的癌细胞中发现的一种转录激活因子（Semenza & Wang，1992），在细胞低氧适应过程中发挥着重要作用。HIF-1 由

收稿日期：2003 - 11 - 17；接受日期：2004 - 02 - 18
基金项目：中国科学院知识创新工程重大项目实验站观测专题（KZCX1 - SW - 01 - 01A5）；中国科学院创新重大项目课题（KZCX1 - 09 - 01）；中科院海北高寒草甸生态系统开放试验站基金项目
*通讯作者（Corresponding author），Tel：0971 - 6143618，E-mail：xqzhao@public.xn.qh.cn

HIF-1α 和 HIF-1β 组成（Wang & Semenza，1993）。模拟环境低氧研究表明低氧诱导 HIF-1α 蛋白的表达，并作用于其下游一系列靶基因，从而引起各种生理反应（Semenza，2000）；常氧条件下 HIF-1α 蛋白迅速降解（Semenza，2001）。HIF-1α 在转录水平表达的研究结果不完全相同：Wenger 等的研究认为 HIF-1α mRNA 在细胞中是构建性表达，低氧条件下小鼠各组织中 HIF-1α mRNA 水平不发生变化（Wenger et al，1996）；然而有实验表明暴露在急性低氧条件下的正常小鼠肺中 HIF-1α mRNA 受低氧诱导表达（Palmer et al，1998；Yu et al，1998）。

高原鼠兔是生活在青藏高原海拔 3 000 m 以上区域的特有物种，在长期进化过程中，形成了独特的适应高原低温、低氧环境的机制。移居平原地区的高原鼠兔，繁殖特性出现明显的不适应现象，主要表现为雄性高原鼠兔的精子畸形率较高（Zhang et al，2000）。长期生活在高原缺氧环境的高原鼠兔在相对“高氧”条件下，HIF-1α mRNA 的表达情况如何？我们从反向思维出发，研究了低海拔常氧条件下高原鼠兔 HIF-1α 的组织表达情况，从而为进一步揭示 HIF-1α 在高原土著动物低氧适应过程中的分子机制提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材 料

高原鼠兔采集于中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站（37°40′N，101°23′E，海拔 3 200 m，气压为 67.7 kPa）。带到清华大学基因组研究所动物房室温喂养 7 d。断颈处死，在超净工作台中解剖高原鼠兔，取各组织迅速投入液氮中，低温保存备用。

1.2 载体、工具酶及主要的实验试剂

大肠杆菌菌株 DH5α 为实验室保存。载体 pMD18-T、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品。回收试剂盒、ExpressHyb Hybridization Solution 快速杂交试剂盒购自 Clontech 公司。^{32}P 由北京亚辉公司生产。尼龙膜及转模器具为 Pharmacia 公司产品。Prime-a-GeneR Labeling System 标记试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。其他试剂均为国产或进口产品。

1.3 引物合成

参照 Zhao et al（2003a，b）的报道，在 HIF-1α 高度保守的 PAS（PER-ARNT-SIM）功能区域设计 PCR 扩增引物。上游引物序列为 5′-AGT TCT GAA CGT CGA AAA G-3′；下游引物序列为 5′-CAG GAT CAG CAC TAC TTC G-3′。引物合成由上海生工完成，去离子水配制成终浓度为20 μmol/L、－20 ℃冰箱低温保存备用。

1.4 总 RNA 提取、电泳及转膜

高原鼠兔心、肝、脾、肾和脑组织总 RNA 的提取采用 Gibco BRL 公司的 Trizol 试剂，按说明书操作。Ultrospec 3000 分光光度计测其浓度，电泳鉴定总 RNA 质量，－20 ℃冰箱保存备用。

所有的电泳设备都用 DEPC 水处理。取高原鼠兔心、肝、脾、肾和脑组织总 RNA 各 20 μg 于 65 ℃变性 5 min，1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳。

电泳完毕，甲醛变性琼脂糖凝胶用 DEPC 水处理数次后浸泡入 7.5 mmol/L 氢氧化钠中 20 min，毛细管法将各组织总 RNA 转移至尼龙膜（Hybond-N+，Amersham，USA）。紫外交联、80 ℃烘干后密封保存于 4 ℃冰箱。

1.5 cDNA 探针制备

取高原鼠兔脑 0.8 μg 总 RNA 为模板，参照 Promega 公司 RT-PCR 试剂盒说明，在 PCR 管中建立 50 μL 反应体系。反应程序为：48 ℃逆转录 50 min；94 ℃预变性 3 min；94 ℃ 50 s，51 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，行 35 循环；72 ℃延伸 7 min。取 20 μL 反应液进行 1%琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果，按照 Clontech 公司试剂盒说明回收纯化特异性扩增片段。

回收纯化后的片段连接于 pMD18-T 载体上，转化感受态 DH5α 细胞，并完成一系列亚克隆过程，获得带有目的片段的质粒。测序分析得知该片段同鼠的同源性为 89%，说明该片段即为目的片段。用限制性内切酶 *Hin*dⅢ单酶切，得到一约 900 bp 的 cDNA 片段，用作探针，－4 ℃冰箱保存备用。

1.6 Northern 快速杂交

1.6.1 标记、纯化探针　参照 Prime-a-Gene^{R} Labeling System 试剂盒说明，取 30 ng cDNA 室温条件下用［α-^{32}P］dATP、［α-^{32}P］dCTP 标记 3 h，G-50 柱纯化。TopCount 测放射性比活，最终所使用放射性比活为 4×10^{6} cpm/mL。

1.6.2 预杂交、杂交　标记好的 cDNA 探针于 100 ℃变性 5 min 后冰镇 2 min。参照 ExpressHyb Hy-

bridization Solution 试剂盒说明，将 RNA 尼龙膜于 68 ℃杂交箱中预杂交 45 min。取出预杂交液，加入混有纯化好的标记探针的新鲜杂交液，68 ℃杂交 2 h。

1.6.3 洗膜、压屏、信号扫描 用 2 × SSC、0.05% SDS 室温洗膜 20 min，随后用 0.1 × SSC、0.1%SDS 于 45 ℃洗膜 2 次，55 ℃洗膜 2 次，65 ℃洗膜 2 次，每次 20 min，洗至信号特异性比较强的时候停止洗膜。将保鲜膜包被好的杂交膜室温平压于磷屏下 36 h。Storm（Molecular Dynamics）扫描，检测表达信号。

1.6.4 内参选择 选择适宜的内参是 RNA 定量所必不可少的，同家政基因 β-actin 和 GAPDH 相比，28*S* RNA 更适合于低氧条件下转录水平的比较研究。因而本实验选择 28*S* RNA 作为 RNA 定量内参（Zhong & Simons，1999）。

2 结 果

2.1 高原鼠兔各组织总 RNA 的抽提及转膜

采用 Trizol reagent 一步法抽提高原鼠兔心、肝、脾、肾和脑组织总 RNA。分别取各组织总 RNA 20 μg 经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳，溴化乙啶染色，紫外灯下显示，28*S* rRNA 亮度大约是 18*S* rRNA 亮度的 2 倍，表明提取的总 RNA 完整，没有或者很少降解；同时，各组织的上样量大致相同，可以用来转膜（图 1）.

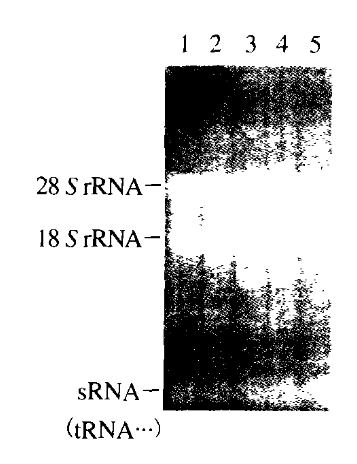


图 1 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析常氧条件下高原鼠兔各组织总 RNA

Fig.1 Formaldehyde agarose gel electrophoresis of plateau pika tissues total RNA under normal oxygen

1：心（Heart）；2：肝（Liver）；3：脾（Spleen）；4：肾（Kidney）；5：脑（Brain）。

毛细管法将高原鼠兔各组织总 RNA 转移到尼龙膜上，将转膜后的琼脂糖凝胶紫外灯下拍照，未检测到 RNA，表明各组织的总 RNA 完全或者基本完全转移到尼龙膜上。

2.2 cDNA 探针

以高原鼠兔脑总 RNA 为模板，制备目的片断，用限制性内切酶 *Hin*dⅢ酶切含有编码区部分片段的质粒，得到 cDNA 特异性片断，回收纯化该片断，作为探针（图 2）.

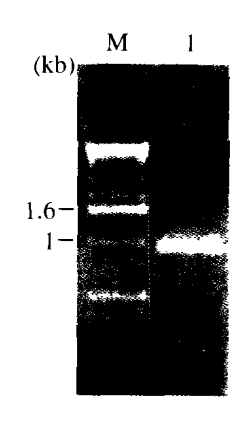


图 2 1%琼脂糖凝胶电泳分析高原鼠兔 HIF-1α cDNA 探针片段

Fig.2 Analysis of plateau pika HIF-1α cDNA probe by 1% agarose gel

M：DNA 标准分子量（DNA marker）；1：高原鼠兔脑（Plateau pika brain）

2.3 常氧高原鼠兔 HIF-1α 的组织表达谱

以高原鼠兔脑 HIF-1α cDNA 片段为探针，利用 Northern 杂交方法，对高原鼠兔心、肝、脾、肾和脑组织 HIF-1α 的转录产物进行分析，了解常氧条件下 HIF-1α 在高原鼠兔不同组织中的表达特征。HIF-1α 在检测的高原鼠兔各组织中均有表达，其中肾中表达量较大，而脑中表达量最大（图 3）.

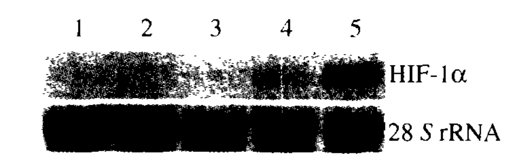


图 3 Northern 杂交探测常氧条件下高原鼠兔 HIF-1α mRNA 表达

Fig.3 Northern blot analysis of plateau pika HIF-1α mRNA expression under normal oxygen

1：心（Heart）；2：肝（Liver）；3：脾（Spleen）；4：肾（Kidney）；5：脑（Brain）；28*S* rRNA：上样内参（Internal control）。

3 讨 论

高原鼠兔是青藏高原特有物种，生活在海拔 3 200 m 到 5 000 m 的区域。本文所选用的高原鼠兔采集于中国科学院海北高寒草甸定位站附近，海拔 3 200 m，气压为 67.7 kPa，氧分压较低，属于缺氧环境。该地区受东南季风和西伯利亚高气压的控制，属于典型的大陆季风气候，日温差较大，平均气温为 -1.7 ℃（Zhao & Zhou，1999）。长期生活在高寒、缺氧环境中，高原鼠兔形成了自己独特的适应方式，已有的研究表明高原鼠兔主要以高的基础代谢率和非颤抖性产热能力来适应严寒（Li et al，2001；Wang et al，1993），以高的氧利用率来适应缺氧环境（Du & Li，1982；Du et al，1984），其具体分子机制有待深入研究。

HIF-1 的发现掀起了细胞低氧信号转导研究的热潮。HIF-1 由 HIF-1α 和 HIF-1β 组成：HIF-1α 是功能亚单位，低氧诱导表达；HIF-1β 是结构亚单位，构建性表达（Wang & Semenza，1993）。有机体众多氧平衡调节有关的生理过程都有 HIF-1 的参与。低氧条件下，HIF-1α 降解途径阻遏，大量的 HIF-1α 蛋白积聚并同 HIF-1β 结合，形成具有活性的 HIF-1，HIF-1 同靶基因的低氧反应元件结合，在转录水平上调节促红细胞生成素、血管内皮生长因子等靶基因的表达，从而引起一系列的生理反应，维持有机体的氧平衡（Semenza，2000）。无论是在细胞水平，还是在有机体局部甚至是整体水平，HIF-1 都是氧感受子与氧效应子之间联系的关键性纽带，而 HIF-1α 可以被认为是细胞低氧适应反应所必需的的核信号（Semenza，1998，1999）。

从 HIF-1α 着手研究高原鼠兔环境低氧适应的分子机理具有可靠的理论基础。我们从高原鼠兔中克隆了 HIF-1α 全长 cDNA，并探测了自然低氧条件下 HIF-1α mRNA 的组织特异性表达（Zhao et al，2004）。在此基础上，我们研究了常氧条件下高原鼠兔 HIF-1α mRNA 的组织特异性表达。Northern 杂交显示 HIF-1α mRNA 在检测的各个组织均有表达，这与 HIF-1α 在有机体内低氧相关事件中广泛发挥作用的假设相一致（Semenza，2000）；另外，HIF-1α mRNA 在高原鼠兔脑中呈特异性的大量表达，其具体的功能意义有待于深入探索。氧是有机体代谢和维持生命活动所必需的，静息状态下仅占体重 2% 的脑消耗了人体总耗氧量的 20%（Schmidt & Thews，1997），脑是如何高效率的利用氧一直是学界期望解决的问题，HIF-1α mRNA 在高原鼠兔脑中的特异性大量表达无疑为从分子水平上解释脑的高效率利用氧的问题提供了思路，同时也为从分子水平上阐释高原鼠兔低氧适应机制提供了线索。

高压或常压下，吸入高浓度的氧达一定时程后，氧对机体产生功能性或器质性损害，可引起氧中毒。高压氧能够抑制细胞呼吸链与氧化磷酸化过程，造成体内 ATP 的供应减少。体外研究表明，高压氧暴露能降低细胞内 Na^+，升高细胞外 K^+，这可能是由于 ATP 减少引起的（Joanny et al，1970；Gyula et al，1977）。同时高压氧对酶有抑制作用，但随着时间的延长，抑制作用可以解除（Chu et al，1998）。Chavez et al（2000）研究了急性低氧条件下大鼠脑中 HIF-1α mRNA 的表达，发现模拟低氧条件下，6 h 到 4 d 时间段内 HIF-1α mRNA 表达逐渐升高，从第 7 天开始到第 21 天逐渐降低，在第 21 天又回到初始水平：表明一个新的有机体氧平衡的重新建立。

根据我们的观察，高原鼠兔移居平原地区开始 3 d 内进食量较少，活动也较少，在第 7 天慢慢回复到可观察到的正常状态，推测其原因之一可能是平原地区的正常氧分压对于高原鼠兔来说是氧过量，导致了有机体内 ATP 合成量减少，同行为相关的各种激素水平发生相应的变化，从而引起机体的适应性反应。随着时间的延长，“高氧”对高原鼠兔的各种抑制作用减轻或解除，高原鼠兔慢慢的适应了“高氧”环境，有机体建立起了新的生理平衡，此时，高原鼠兔又恢复了正常的行为状态。

低氧可引起 HIF-1α mRNA 表达显著升高，而常氧对于长期生活在缺氧环境的高原鼠兔是一种“高氧”刺激。相对“高氧”条件下，高原鼠兔是否通过下调 HIF-1α mRNA 表达来调节有机体在“高氧”环境下建立新的氧平衡有待于进一步的实验证明。

致谢：*感谢北京农业大学赵亚军博士为论文写作提供建议；北京师范大学翟永功博士、汪勇和李聪同学，清华大学高超、朱姗姗、宁红秀等同学在实验过程中提供的帮助。*

参考文献:

Chavez JC, Agani F, Pichiule P, LaManna JC. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia [J]. *J. Appl. Physiol.*, **89** (5): 1937-1942.

Chu WJ, Hetherington HP, Kuzniecky RI, Simor T, Mason GF, Elgavish GA. 1998. Lateralization of human temporal lobe epilepsy by ^{31}P NMR spectroscopic imaging at 4.1 T [J]. *Neurology*, **51** (2): 472-477.

Du JZ, Li QF. 1982. Effects of simulated hypoxic acclimation on organism, organ and hematology in *Ochotona curzoniae* and rats [J]. *Acta Theriologica Sinica*, **2** (1): 35-42. [杜继增, 李庆芬. 1982. 模拟高原低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响. 兽类学报, **2** (1): 35-42.]

Du JZ, Li QF, Chen XG. 1984. Effect of chronic hypoxia on liver of *Ochotona curzoniae* and rats [J]. *Acta Zool. Fennica*, **6** (4): 261-266.

Gyula B, Mechael J, Niels H. 1977. Inhibitory effect of high oxygen pressure on potassium-induced activation of pyruvate dehydrogenase and glucose metabolism in rat brain slices [J]. *Biochem. Biophys. Acta*, **462** (4): 493-496.

Joanny P, Corriol J, Brue F. 1970. Hyperbaric oxygen: Effects on metabolism and ionic movement in cerebral cortex slices [J]. *Science*, **167** (924): 1508-1511.

Li QF, Sun RY, Huang CX, Wang ZK, Liu XT, Hou JJ, Liu JS, Cai LQ, Li N, Zhang SZ, Wang Y. 2001. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **129**: 949-961.

Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. 1998. Hypoxia induces type Ⅱ NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1 [J]. *Am. J. Physiol.*, **274** (18): L212-L219.

Schmidt RF, Thews G. 1997. Physiologie des Menschen [M]. Berlin: Springer.

Semenza GL. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O_2 homeostasis [J]. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8** (5): 588-594.

Semenza GL. 1999. Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**: 551-578.

Semenza GL. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences [J]. *Biochem. Pharmacol.*, **59**: 47-53.

Semenza GL. 2001. HIF-1, O_2, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus [J]. *Cell*, **107**: 1-3.

Semenza GL, Wang GL. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer [J]. *Mol. Cell Biol.*, **12**: 5447-5454.

Wang GL, Semenza GL. 1993. Characterization of hypoxia-inducible factor-1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia [J]. *J. Biol. Chem.*, **268**: 21513-21518.

Wang DH, Sun RY, Wang ZW. 1993. Evaporative water loss and thermoregulation in plateau pika (*Ochotona curzoniae*) [J]. *Acta Zool. Fennica*, **13** (2): 104-113.

Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guenet JL, Gassmann M. 1996. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **223** (1): 54-59.

Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. 1998. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung [J]. *Am. J. Physiol.*, **275** (4 Pt 1): L818-826.

Zhang DF, Wang Y, Bao SM, Zhang RZ, Zhao GJ. 2000. China *Herbivores*, **2** (1): 16-17. [张德福, 王 英, 鲍世明, 张瑞忠, 赵国际. 2000. 上海地区高原鼠兔若干繁殖特性的观察——Ⅰ. 雄性鼠兔的繁殖特性. 中国草食动物, **2** (1): 16-17.]

Zhao XQ, Zhou XM. 1999. Ecological basis of alpine meadow ecosystem management in Tibet: Haibei alpine meadow ecosystem research station [J]. *Ambio.*, **28**: 642-647.

Zhao TB, Zhao XQ, Chang ZJ, Zhu SS, Zhao W, Sun P, Xu SX. 2003a. A preliminary study of plateau pika (*Ochotona curzoniae*) hypoxia-induced factor-1α (HIF-1α) [J]. *Acta Theriologica Sinica*, **23** (3): 273-276. [赵同标, 赵新全, 常智杰, 朱姗姗, 赵 伟, 孙 平, 徐世晓. 2003a. 高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 低氧诱导因子-1α (HIF-1α) 的初步研究. 兽类学报, **23** (3): 273-276.]

Zhao TB, Zhao XQ, Chang ZJ, Zhao W, Sun P, Xu SX, Song YL. 2003b. Rapid cloning homologous cDNA from different species [J]. *Biotechnology Bulletin*, (5): 13-18. [赵同标, 赵新全, 常智杰, 赵 伟, 孙 平, 徐世晓, 宋娅莉. 2003b. 相异物种同源基因 cDNA 的快速克隆. 生物技术通报, (5): 13-18.]

Zhao TB, Ning HX, Zhu SS, Sun P, Xu SX, Chang ZJ, Zhao XQ. 2004. Cloning of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) cDNA from a high hypoxia tolerant mammal plateau pika (*Ochotona curzoniae*) [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**: 565-572.

Zhong H, Simons JW. 1999. Direct comparison of GAPDH, β-actin, cyclophilin, and 28S RNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **259**: 523-526.